

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 表 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-504561

(13)公表日 平成8年(1996)5月21日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I
C 12 P 21/02	C 9282-4B		
C 07 K 14/79	8318-4H		
C 12 N 1/19	8828-4B		
	9281-4B	C 12 N 15/00	A
	7729-4B	5/00	A
審査請求 有	予備審査請求 有	(全 29 頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願平5-519314	(71)出願人	ベイラー・カレッジ・オブ・メディシン アメリカ合衆国77030テキサス、ヒュース トン、ワン・ベイラー・ブライザ(番地の表 示なし)
(22)出願日	平成5年(1993)4月16日	(72)発明者	コニーリー、オーラ・エム アメリカ合衆国77025テキサス、ヒュース トン、ナンバー1907、サウス・ブレイスク ッド2801番
(35)翻訳文提出日	平成6年(1994)10月24日	(72)発明者	ヘドン、デニス・アール アイルランド、ゴールウェイ、ダンガン・ ローワー、アグナクラ、リシン(番地の表 示なし)
(86)国際出願番号	PCT/US93/03614	(74)代理人	弁理士 青山 葉 (外1名) 最終頁に続く
(87)国際公開番号	WO93/22348		
(87)国際公開日	平成5年(1993)11月11日		
(31)優先権主張番号	07/873,304		
(32)優先日	1992年4月24日		
(33)優先権主張国	米国(US)		

(54)【発明の名称】 細挽えヒトラクトフェリンの製造

(57)【要約】

本発明は、新規プラスミド、トランスクレクションした真核細胞、およびこれらプラスミドおよびトランスクレクションした真核細胞の製造方法を提供する。該新規プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするcDNAを含有する。アスペルギルス・オリゼーにおけるヒトラクトフェリンタンパク質の製造方法も提供される。それゆえ、本発明は、細挽えヒトラクトフェリンの効率的かつ経済的な製造方法を提供する。

【特許請求の範囲】

1. 選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列、およびリンカー配列を連結し、該配列をクローニングしてプラスミドを生成させ、該プラスミドを制限エンドヌクレアーゼで消化し、ラクトフェリンをコードするcDNAを制限部位に挿入し、ついでラクトフェリンcDNAを発現する該プラスミドで真核細胞を形質転換することを特徴とする、生物学的に活性な組換えラクトフェリンの製造方法。
2. 該選択マーカー遺伝子がpYR4、pYRG、and S、argBおよびtrpCよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。
3. 該細胞がラクトフェリンを発現する請求項1に記載の方法。
4. 請求項2に記載の方法により製造されたラクトフェリン。
5. 該プロモーターがアルコールデヒドロゲナーゼ、argB、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。
6. 該転写停止配列が、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。
7. 該リンカー配列が α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびラクトフェリンよりなる群から選ばれたものである請求項1に記載の方法。
8. 図6記載のcDNAおよび真核細胞中で該cDNAを発現させるのに必要な制御要素からなる、真核細胞中での発現に適合されたプラスミド。
9. pAhLFGであるプラスミド。
10. 請求項8に記載のプラスミドを含む真核細胞。
11. 該真核細胞が真菌細胞および昆虫細胞よりなる群から選ばれたものである請求項10に記載の真核細胞。
12. 該昆虫細胞がSF9である請求項11に記載の真核細胞。
13. 該真菌細胞が酵母である請求項11に記載の真核細胞。
14. 該酵母細胞がアスペルギルスである請求項13に記載の真核細胞。

15. 該アスペルギルス株がアスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニデュランスおよびアスペルギルス・アワモリよりなる群から選ばれたものである請求項14に記載の真核細胞。

16. ラクトフェリンタンパク質をコードするボリデオキシリボヌクレオチドを有するプラスミドベクターを含む組換えプラスミドを含有する形質転換体真核細胞を、ラクトフェリンタンパク質が生成されるまで適当な栄養培地中で培養し、ついで該ヒトラクトフェリンを単離することを特徴とする、ラクトフェリンの製造方法。

17. (1) 遺伝子発現において制御的役割を有する1または複数の遺伝子要素、(2) ヒトラクトフェリンをコードするcDNA、および(3) 適当な転写および翻訳開始および停止配列の集合からなる転写単位を有する組換え発現ベクター。

18. 該遺伝子要素がプロモーターである請求項17に記載のベクター。

19. 該プロモーターがアルコールデヒドロゲナーゼ、argB、 α -アミラーゼ、グルコアミラーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項18に記載のベクター。

20. 該転写停止配列が α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼおよびbenAよりなる群から選ばれたものである請求項17に記載のベクター。

21. 請求項16に記載の方法によるタンパク質生成物。

【発明の詳細な説明】

組換えヒトラクトフェリンの製造

発明の背景

発明の技術分野

本発明は一般に鉄結合性糖タンパク質の分野に関する。さらに詳しくは、本発明はヒトラクトフェリンの組換え製造に関する。

関連技術の記載

ヒトラクトフェリン (Lf F) は、鉄結合性モノマー糖タンパク質のトランスクルタクトフェリンファミリーの一員である。ヒトラクトフェリンは最初に乳中で発見され、初乳では 7 グラム / リットルのレベルまで達することがある。Lf F は以来、涙、唾液および粘膜分泌液などの他の外液中で検出されており、多形核白血球の二次顆粒中でも検出されている。

Lf F は、C 末端半分と N 末端半分とで高い相同性を有する 2 葉性構造を有する 78 kDa の糖タンパク質であり、該相同性はアミノ酸および 3 次元構造の両レベルで明らかである。これら各葉状構造は一つの鉄 (III) イオンと高い親和性で可逆的に結合することができ、それと同時に重炭酸塩も結合する。ラクトフェリンに対して提唱されている生物学的機能としては、微生物感染に対する防御、幼児における腸内での鉄吸収の増進、細胞増殖の促進、骨髄造血の制御および炎症応答の修飾が挙げられる。

細胞外糖タンパク質の工業的生産において、糸状菌は宿主として首尾よく使用されている。ある種の工業的株は、これら糖タンパク質をグラム量で分泌することができる。加えて糸状菌は真核性タンパク質の翻訳後修飾を正確に行うことができ、多くの株は米国食品医薬品局の認可を得ている。さらに、大スケールの発酵技術および下流プロセッシング経験 (downstream processing experience) を利用することができる。

現在のところ、ヒト Lf F を製造するための効率的かつ経済的な方法は存在しない。従って、栄養学的および治療学的適用さらに作用メカニズムのさらなる探求のためのヒトラクトフェリンの効率的製造方法の開発により、長い間の懸念であつ

た必要性と当該技術分野における記載が達成されるであろう。

発明の要約

一つの態様において、本発明は、ヒトラクトフェリンのcDNAを含む組換えプラスミドを提供する。本発明のプラスミドは、真核細胞中での発現用に適応されており、該真核細胞中でヒトラクトフェリンcDNAを発現するのに必要な制御要素を含む。

他の態様において、本発明は、組換えプラスミドを包含する形質転換した真核細胞を提供する。真核細胞は、アスペルギルス(Aspergillus)を含む一群の糸状菌から選択される。プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするポリデオキシリボヌクレオチド断片を挿入したプラスミドベクターを含む。

本発明のさらに他の態様において、組換えプラスミドを含む形質転換した真核細胞を培養することを包含する、組換えヒトラクトフェリンの製造法が提供される。プラスミドは、ヒトラクトフェリンタンパク質をコードするポリデオキシリボヌクレオチドを有するプラスミドベクターを含む。ヒトラクトフェリンタンパク質が生成されるまで適当な栄養培地で培養した後、ヒトラクトフェリンタンパク質を単離する。

本発明のさらに別の態様において、組換え発現ベクターが提供される。このベクターは、(1) 遺伝子発現における制御的役割を有する1または複数の遺伝子要素；(2) ヒトラクトフェリンをコードするcDNA；(3) 適当な転写および翻訳開始および停止配列；および(4) 該ベクターで形質転換されたアスペルギルス胞子の選択のための遺伝子要素の集合からなる転写単位を包含する。

本発明のさらに別の態様において、生物学的に活性な組換えラクトフェリンの製造方法が提供される。該方法は、選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列、およびリンカー配列を合成し、これら配列をクローニングしてプラスミドを生成し、該プラスミドを制限エンドヌクレアーゼで消化し、ラクトフェリンをコードするcDNAを制限部位に挿入し、ついでラクトフェリンcDNAを発現するプラスミドで真核細胞を形質転換することからなる。

上記本発明の特徴、利点および目的並びにこれから明らかになるであろう他の特徴、利点および目的が得られさらに詳細に理解され得るように、上記で簡単に要約した発明の一層詳細な記載を、添付の図面で説明するある種の態様を参照しながら行う。これら図面は本明細書の一端を構成する。しかしながら、添付の図面は本発明の好ましい態様を説明するものであって、本発明の範囲を限定するものでないことに注意すべきである。本発明は、他の同様に有効な等価な態様を包含する。

図1は、アスペルギルス・オリゼー (*aspergillus oryzae*) 発現プラスミド、pA b 1 T g の模式図を示す。

図2は、形質転換したアスペルギルス・オリゼー株のサザーンプロット分析を示す。

図3は、形質転換体とコントロール A 0 7とのRNA分析を示す。

図4は、組換えLF分認および精製の銀染色 SDS-アクリルアミドゲル分析を示す。

図5は、ヒト組換えLFの特徴付けを示す。

図6は、ヒトラクトフェリンのcDNA配列を示す。

発明の詳細な記載

定義

本出願の目的のため、「トランスフェリンファミリー」なる語は、血清トランスフェリン、卵トランスフェリンおよびラクトフェリンを含む鉄輸送タンパク質のファミリーを意味する。これらタンパク質はすべて構造的に関連している。

本出願の目的のため、「ベクター」なる語は、ラクトフェリンcDNAの挿入、伝播および発現を可能とするプラスミドビヒクルを意味する。

本出願の目的のため、「宿主」なる語は、そのゲノム中にラクトフェリン発現プラスミドの組み込みを可能とするすべての真核細胞を意味する。

本出願の目的のため、「プロモーター」なる語は、ラクトフェリンcDNAの転写を制御する制御cDNA配列を意味する。

本出願の目的のため、「マルチブルクローニングカセット」なる語は、種々の

cDNAの挿入を可能とする種々の酵素のための制限酵素開裂部位を含むDNA断片を意味する。

本出願の目的のため、「形質転換」なる語は、当該真核細胞によるプラスミドの取り込みを意味する。

本出願の目的のため、「鉄結合能」なる語は、 ^{59}Fe に結合する能力を意味する。完全に機能性のラクトフェリンは、1分子のLF当たり2原子の鉄と結合することができる。

本出願の目的のため、「生物学的活性」「生物学的に活性」なる語は、鉄への結合能によって測定されるラクトフェリンの生物学的活性を意味する。ラクトフェリンタンパク質は鉄の輸送タンパク質として機能し、生物学的に活性であるためには鉄に結合する必要がある。

本明細書において引用する文献はすべて、参照のため本明細書に引用する。

以下に挙げる実施例は本発明の種々の態様を説明するためのものであり、いかなる形であれ本発明を限定することを意図するものではない。

実施例1

真菌株および形質転換

これら研究において使用する $\text{p}_{YFR}G$ 変異株は、アスペルギルス・オリゼー (A07-11488) に由来するものであった。アスペルギルス・オリゼーからの $\text{p}_{YFR}G$ 遺伝子を4-ニトロキノリン-1-オキシドで変異させた。このアスペルギルスの形質転換は、オスマニ (Osmani) らの手順 (J. Cell Biol. 104: 1495~1504 (1987)) の修飾により行った。5 mMウラシルおよび1.0 mMウリジンを含有するYG培地 (0.5%酵母エキス、2%グルコース) (50 ml) 中に分生子 ($1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$) を接種した。菌の管状物が目に見えるようになるまで、32°Cにて14~16時間増殖させた。発芽した分生子を遠心分離により回収し、0.4 M硫酸アンモニウム、5.0 mMクエン酸カリウム (pH 6.0)、0.5%酵母エキス、0.12 g ノボザイム (novozyme)、0.1 g ドリセラーゼ (Driselase)、1.00 μl β -グルクロニダーゼ、0.5%ショ糖および1.0 mM MgSO_4 を含有する溶解混合物 (40 ml) 中に再懸

濁した。32°C、150 rpmにて2~3時間、プロトプラスト化を行った。プロトプラスト化の後、未消化の菌体を除去するために、滅菌ミラクロス (air cloth) を用いた済過が必要であった。プロトプラストを遠心分離により回収し、10mlの0.4M硫酸アンモニウム、1%ショ糖および50mMクエン酸カリウム (pH 6.0) で4°Cにて2回洗浄し、1mlの0.6M KCl: 50mM CaCl₂; 10mMトリス-HCl (pH 7.5) 中に再懸濁し、氷上に置いた。プロトプラスト調製の直後に形質転換を行った。プロトプラストのアリコート (100 μl) を、3 μgのDNAおよび50 μlの40%ポリエチレングリコール (PEG) 6000、50mM CaCl₂、0.6M KClおよび10mMトリス-HCl (pH 7.5) に加えた。試料を氷上で15分間インキュベートし、その後、PEG溶液をさらに1ml加え、室温でのインキュベーションを30分間続けた。この混合物のアリコートを、0.4%硫酸アンモニウムを添加した0.7%最小培地 (3ml) 中、同じ成分を含有するが2%アガード固化したプレート上にプレーティングした。その後の増殖はすべて32°Cで行った。

実施例2

プラスミドの構築

発現プラスミドの模式図を図1に示す。ヒトL福をコードする完全cDNAをDNAポリメラーゼIのクレノウ断片を用いて修復し、AccI消化し修復したpGEM4中にサブクローニングしてpGEMhLFcを得た。LFシグナル配列を除去しα-アミラーゼ配列とインフレームにあるう"末端を生成させるため、pGEMhLFcプラスミドDNAの複製連鎖反応 (PCR) 増幅により、HindII/AccI末端を含有する252塩基対のラクトフェリン断片 (69~321番目) を得た。使用したオリゴプライマーは以下の通りであった。SEQ ID NO 1に示す5'末端オリゴヌクレオチド:

(CTGGGTGACGTAGGAGAAGGGAGTGTTCAGTGGTGC)

およびSEQ ID NO 2に示す3'末端オリゴヌクレオチド:

(GCCGTAGACTCCGGCGTACAGG)

このPCR断片をHindIIおよびAccIで消化し、HindII/AccI

消化した p G E M h L F C 中にサブクローニングして p G E M h L F を生成した。プロモーター、シグナル配列および成熟 α -アミラーゼ II 遺伝子の開始部からのアラニン残基をコードする A s p 7 1 8 / P v u I I 末端を有する 6 8 1 塩基対の α -アミラーゼ断片を、アスペルギルス・オリゼーのゲノム DNA の P C R 増幅により得た。オリゴプライマーは以下の通りであった。S E Q I D N O 3 に示す 5' 末端オリゴヌクレオチド：

(GAGGTACCGAATTATGGTGTGATCATTTAAATTTAT)

および S E Q I D N O 4 に示す 3' 末端オリゴヌクレオチド：

(AGCAGCTGCAGCCAAAGCAGGTGCCGGACCTGAAGGCCGTACAG)

増幅した DNA を A s p 7 1 8 および P v u I I で消化し、A s p 7 1 8 / H i n d I I 消化した p G E M h L F 中にサブクローニングした。得られたプラスミド (p G E M a h L F) を E c o R I で消化し、得られた 2.8 k b α -アミラーゼラクトフランクチン断片を、p A h L F * を生成するための方法に従って p A L 3 中の唯一の E c o R I 部位にサブクローニングした。p A h L F * で失われたラクトフェリンの最後の 5 つのカルボキシ末端コドン (2 1 3 8 ~ 2 1 5 3 番目) を提供するため、およびアスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ遺伝子からの 3' 非翻訳配列の最初の 1 8 0 塩基対を提供するため、合成オリゴヌクレオチドを用いた。得られたプラスミド (p A h L F G) を用いてアスペルギルス・オリゼー p y r G 変異株を形質転換させた。

図 1 を参照すると、アスペルギルス・オリゼー発現プラスミド p A h L F G は、アスペルギルス・オリゼー A M Y 1 1 遺伝子の 5' - フランキング配列の 6 8 1 塩基対 (シグナル配列および成熟 α -アミラーゼの最初のコドンを含む) を含む。これら配列から下流にインフレームで成熟ヒトラクトフェリンをコードする c DNA をサブクローニングして、増殖培地にデンプンを添加することによって組換えタンパク質の产生を可能する。アスペルギルス・ニガーのグルコアミラーゼ 3' 非翻訳領域は、転写ターミネーターおよびボリアデニル化シグナルを提供する。このプラスミドはまた、ニューロスボラ・クラッサ (Neurospora crassa) p y r 4 選択マーカーおよびアンピシリン耐性遺伝子をも含有する。

ヒトL.F.の発現に用いるプラスミド構築物（pA h L F G）は、アスペルギルス・オリゼーα-アミラーゼ遺伝子（AMY11）のプロモーターおよび分泌シグナルペプチドをコードする681塩基対断片を含有する。シグナル配列はまた、α-アミラーゼ成熟タンパク質の開始部からのアラニンのコドンを含み、エンドゲナーゼであるα-アミラーゼペプチダーゼにより認識され得るシグナル配列開裂部位（Leu-Ala-Ala）を生成する。成熟タンパク質をコードするヒトラクトフェリンcDNA断片をAMY11配列のすぐ下流にインフレームでサブクローニングし、この高度に効率的なデンプン誘導性プロモーターの制御下に置いた。転写されたヒトL.F. mRNAを安定化させるため、アスペルギルス・ニガーからのグルコアミラーゼ遺伝子の3'非翻訳領域をコードする180塩基対断片を、ヒトL.F. cDNAのすぐ下流のマルチブルクローニングカセット中の唯一のBamHI部位中にライゲートして、転写ターミネーターおよびボリアテニル化シグナルを提供した。このプラスミドにはまた、アスペルギルス・オリゼーのpyrG栄養要求性変異を補償するニューロスボラ・クラッサPyr4選択マーカーも含まれ、ウリジンの不在下で増殖させることによってプラスミドで形質転換された胞子の選択を可能としている。

実施例3

ゲノムDNAの操作

アスペルギルス・オリゼーのDNAの単離は、ラフムッセン（Rasmussen）らのJ. Biol. Chem.、265: 13767~13775 (1990) に記載された方法に従い、凍結乾燥した菌糸体 (200 mg) から行った。このDNAをEcoRIで消化し、0.8%アガロースゲル上でサイズ分画し、ニトロセルロースに移した。サザーン分析のためのニトロセルロースフィルターのプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションを、6×SSC, 0.1%SDSおよび0.5%粉乳中、65°Cで16時間行った。ハイブリダイゼーション溶液には 1×10^7 cpmの³²P-標識ラクトフェリンcDNAプローブ (2.1 Kb) が含まれていた。フィルターを2×SSC, 0.5%SDS中、室温にて30分間洗浄し、ついで0.5×SSC, 0.5%SDS中、68°Cで30分間、

2回洗浄した。フィルターを乾燥させ、-70°Cで2時間感光させ、オートラジオグラフィーにより現像した。

図2を参照すると、形質転換したアスペルギルス・オリゼー株に対してサザンプロット分析を行った。個々の形質転換体およびコントロールAO7からのゲノムDNAを放射性標識³²P-cDNAプローブ(2, 1 kb)とハイブリダイズさせた。矢印は、発現プラスミドのEcoRI消化によって生成する放射性標識断片(2, 8 kb)を示し、これはすべての形質転換体(№1~9)には存在するがコントロールの非形質転換AO7には存在しない。バクテリオファージラムダHindIII断片の分子量を左側に示す。

実施例4

ノーザン分析

市販のRNazolB(ビオキシティック・ラボトリーズ、ヒューストン、テキサス州)を用い、製造業者の指示に従ってRNAを凍結乾燥菌糸体(200 mg)から単離した。2, 2 Mホルムアルデヒドを含有する0.8%アガロースゲル中で全RNA(20 μg)を電気泳動にかけた。RNAをニトロセルロースに移し、2, 1 kbのラクトフェリンcDNAかまたはα-アミラーゼ11遺伝子のコード領域に対応する1, 8 kbのゲノムα-アミラーゼ断片のいずれかとハイブリダイズさせた。プローブをニックトランスレーションにより³²P-標識した(比活性: 2×10^8 cpm/μg)。ハイブリダイゼーションを、2×SSC、0.05%粉乳中、65°Cにて氷上、 2×10^5 cpmプローブ/mlで行った。

洗浄はサザン分析に用いたものと同じであった。フィルターを乾燥させ、-70°Cにて2時間感光させ、オートラジオグラフィーにより現像した。ニトロセルロース膜およびマニホールド(manifold)ドットシステムを用いてRNAドットプロッティングを行った。ハイブリダイゼーションおよび洗浄条件はサザン分析に記載したものと同様であった。放射能をベタゴン(betagon)プロットアナライザを用いて定量した。

ラクトフェリンタンパク質の組換え産生をその好ましい態様において記載した。しかしながら、サッカロミセス・セレビシエ(*saccharomyces cerevisiae*)やビ

キア・パストルシス (*pitchia pastoris*) などの真菌源または SF 9 などの昆虫細胞などの他の多くの採取源で產生させることも可能である。

図 3 において、RNA 分析を形質転換体とコントロール AO 7 を比較して行った。パネル A では、コントロール AO 7 および形質転換体 #1 からの RNA (2.0 μ g) を放射性標識ヒト LF cDNA とハイブリダイズさせたノーザン分析を示す。ヒト LF mRNA (2, 3 kb) が形質転換体 #1 では検出されたが、コントロールの非形質転換 AO 7 では検出されなかった。2.8 s および 1.8 s rRNA バンドの位置を左側に示す。パネル B では、放射性標識 α -アミラーゼゲノム DNA プローブを用いた、コントロール AO 7 および形質転換体 #1 からの RNA (5 および 10 μ g) のドットプロットを比較して示す。パネル C では、放射性標識ヒト LF cDNA プローブを用いた、コントロール AO 7 および形質転換体 #1 からの RNA (5 および 10 μ g) のドットプロットを比較して示す。

本発明の発現プラスミドの制御要素下でラクトフェリン mRNA がアスペルギルス・オリゼー中に正確かつ効率的に転写されるか否かを決定するためにノーザン分析を行った。形質転換体 #1 からの胞子 (1×10^6 / ml) およびコントロールの非形質転換胞子を、炭素源として 1, 5% グルコースを含有する真菌培地中に接種し、小さなシェークフラスコ培地中、30°C にて 48 時間増殖させた。培養液を洗浄し、3% デンブンを含有する真菌培地中に再接種してヒト LF mRNA の転写を誘導した。24 時間後、細胞を回収し、RNA を単離した。2.2 M ホルムアルデヒドを含有する 1, 0% アガロースゲル上で全 RNA (2.0 μ g) をサイズ分画し、ニトロセルロース上にプロッティングした。

ヒトラクトフェリン mRNA の検出は 32 P 標識したヒト LF cDNA (2.0 kb) プローブを用いて行った。ヒト LF 放射性標識 cDNA プローブとのハイブリダイゼーションは、形質転換体においてラクトフェリン mRNA に対する正確なサイズにて (2, 3 kb) 特定の放射性標識バンドを検出したが、コントロールの非形質転換体では検出されなかった (図 3 A)。ドットアッセイによる mRNA レベルの定量は、コントロールの AO 7 と形質転換体 #1 との間で匹敵

し得るレベルの内生 α -アミラーゼ rRNA の発現を示した(図 3B)。加えて、形質転換体 #1 では α -アミラーゼとヒト LF-mRNA とで同様のレベルの発現が認められた(図 3B および 3C)。

実施例 5

ヒト組換えLFの精製

増殖培地からの LF の精製は、実質的にストウェル (Stowell) らの Biochem. J. 276: 349~59 (1991) の記載に従い、CMセファデックス C 50 を用いて行った。カラムを 500 ml の 0.025 M トリス HCl (pH 7.5)、0.1 M NaCl で前以て平衡化した。該前以て平衡化したカラムに適用する前に培地の pH を pH 7.4 に調節した。カラムを平衡緩衝液 (500 ml) で洗浄し、ついで 0.1~1.1 M NaCl の直線塩勾配により洗浄した。SDS-PAGE および銀染色を用い、フラクション(全部で 7 ml) をラクトフェリン含量および純度についてアッセイした。LF を含有するフラクションを 0.025 M トリス HCl、pH 7.5 / 0.1 M NaCl に対して透析し、凍結乾燥させた。

実施例 6

ヒトLFの定量

本質的にヒルジャ (Vilja) らの J. Immunol. Methods. 76: 73~83 (1985) の記載に従い、ELISA アッセイを用いて粗換えラクトフェリンを定量した。非結合アビシン-ビオチンアッセイを用いて 5 ng のラクトフェリン感度が得られた。乳房乳から単離したヒト LF (シグマ) を標準として用いた。ビオチン化したヒトラクトフェリン 1 g G はジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ (Jackson Immunoresearch Laboratories)、ウエストグループ、ベンシルベニア州から得た。

実施例 7

N末端の配列決定

製造業者の指示に従い(アプライド・バイオシステムズ)、精製ヒト組換えLF (5 μ g) を SDS-ポリアクリルアミドゲル上で分離させ、プロプロット

(Probiott) (ポリビニリデンジフルオライド型の膜) に移した。ヒトLFをクマシーブリリアントブルー染色で検出し、脱色した。このヒトLFのバンドを切り出し、蒸留H₂Oで充分に洗浄し、空気乾燥させた。ヒトLFの最初の10アミノ酸のN末端アミノ酸配列を、アラライド・バイオシステムズのパルス (Pulse) - 液相シーケンサー (モデル 477A) を用いて自動エドマン分解法により決定した。

図4を参照すると、パネルAは、組換えヒトLF分泌および精製の銀染色SDS-ポリアクリラミドゲル分析を示す。レーン1には乳房乳ヒトLF標準 (400ng) が含まれる。レーン2および3には、それぞれ誘導コントロールAO7および形質転換体#1からの増殖培地の試料 (40μg) が含まれる。レーン4~8には、形質転換体#1の増殖培地からの組換えLFのCM-セファデックス精製により回収した溶出フラクション (それぞれ、#25, 30, 35, 40および45) の100μlアリコートが含まれる。分子量マーカー (バイオラド・ラボラトリーズ、リッチモンド、カリフォルニア州) の位置を左側に示す。サイズはキログルトンにて示す。パネルBは、ヒトLFに対して向けられた特異的ポリクローナル抗体を用いて¹²⁵I-アプロテインAで検出する、パネルAの記載と同じ2つの試料のウエスタンブロット分析を示す。パネルCは、組換えヒトLFの#6N末端アミノ酸配列を示す。組換えヒトLFをN末端から10の残基で配列決定したが、本発明の構築物においてアラニンが付加されてα-アミラーゼシグナル配列開裂部位を提供すること以外は乳房乳ヒトLFと同一である。

実施例8

脱脂付加

N-グリコシダーゼF (ヘーリンガー・マンハイム) を用いて脱脂付加を行った。ラクトフェリン (0.5μg) を含有するアスペルギルス・オリゼーの増殖培地を0.01% SDSの存在下、100°Cにて3分間変性させた。ヒト乳からの標準LFも同様に処理した。その後、試料を氷上に5分間置いた。N-グリコシダーゼF反応を0.4Mリン酸ナトリウム (pH 6.8) : 0.08%トリトン; 0.1%β-メルカプトエタノールおよび1単位酵素中で行い、37°Cで16時

間インキュベートした。ヒトラクトフェリンに対して特異的に向けられた Ig G を用いて PAGE およびウエスタン分析を行い、消化した試料の移動度の増加を検出した。

図5にヒト組換えLFの特徴付けを行った。パネルAはラクトフェリンの脱糖付加を示す。パネルBはラクトフェリンの脱糖付加を示す。ヒトラクトフェリンに対して向けられた特異的なポリクローナル抗体を用いて糖付加したラクトフェリンおよび脱糖付加したラクトフェリンのウエスタン分析を行い、検出は¹²⁵I-アプロテインAを行った。第一のパネルには、NグリコシダーゼFで処理していない（-）および処理した（+）初乳ヒトLF（500ng）が含まれる。第二のパネルには、NグリコシダーゼFで処理していない（-）および処理した（+）精製組換えヒトLF（500ng）が含まれる。糖付加したヒトLFのサイズを矢印で示す。パネルAおよびBは、それぞれ、示した濃度における初乳ヒトLFおよび精製組換えヒトLFの2つの試料の¹²⁵I-Fcフィルター結合アッセイを示す。両パネルにおける第一のレーンには、陰性コントロールとしてBSA（5μg）が含まれる。

ラクトフェリンは、N-グリコシド結合により結合した2つのN-アセチルラクトアミン型のグリカンを含む。組換えラクトフェリンが正確に糖付加されるかどうかを決定するため、該タンパク質をN-グリコシダーゼFで処理し、SDS-ポリアクリラミド電気泳動上で分離し、ニトロセルロースに移し、ヒトラクトフェリンに対して向けられた特異的Ig Gを用いてプローブした（図5A）。N-グリコシダーゼFはグリコシルアミン結合において加水分解して、分子量の小さい炭水化物不含有のペプチドを生成する。組換えLFをヒト乳から精製したLFと比較すると、N-グリコシダーゼF消化によって両タンパク質とともに一緒に移動し、該組換えタンパク質が天然LFと同じ糖付加パターンを有することが示唆された。

ラクトフェリンは、各葉状部が一つのFe³⁺イオンと堅固だが可逆的に結合する能力を有する2葉性構造を有する。ラクトフェリンの鉄結合特性は、その機能

的役割にとって非常に重要である。アスペルギルス・オリゼーで発現され分離された組換えヒト L F が初乳ラクトフェリンと同様の鉄結合能を有するかどうかを試験するため、⁵⁶Fe マイクロフィルター結合アッセイを開発した。形質転換体 #1 の増殖培地から単離した精製ヒトラクトフェリンを 0.1 M クエン酸 (pH 2.0) に対して透析してアボーヒト L F を生成した。ヒト乳からの天然ラクトフェリンも同様に処理した。等容量の 1 M 重炭酸塩中のこれら試料に過剰の⁵⁶Fe (0.2 mM) を加え、ついで 37°C にて 30 分間インキュベートした。試料をニトロセルロース膜に適用し、重炭酸塩で数回洗浄した。オートラジオグラフィーによりフィルターを視覚化し、ベタゴンプロットアナライザーを用いて Fe-56 結合を定量した。図 5B に示すように、試験したすべての濃度において組換え L F および天然 L F の両方とも同様の鉄結合レベルを示した。これら結果は、鉄結合能において組換えヒト L F が天然ヒト L F と識別できないことを示している。

図 6において、ヒトラクトフェリンタンパク質の全 cDNA 配列を示す。ラクトフェリンをコードする cDNA は、プラスミドを生成し、真核細胞を形質転換し、ラクトフェリンタンパク質を製造するために用いる。

本発明において使用するアスペルギルスの株は、欠損 pxy4 遺伝子を含むためオロチジン 5' リン酸 (OMP) デカルボキシラーゼを合成することができない栄養要求変異株である。この酵素は、ウリジンの合成に必要である。この株はウリジンを欠く培地で増殖できない。このプラスミドは、選択マーカー、すなわち OMP デカルボキシラーゼの遺伝子をコードする配列を含む。それゆえ、アスペルギルスによる該プラスミドの取り込みは、ウリジンを欠く培地上で増殖させることによって選択することができる。アスペルギルスは、ウリジン欠失培地上で増殖できるように該プラスミドにより形質転換される。

本発明の一つの態様において、生物学的に活性な組換えラクトフェリンタンパク質が製造される。この方法は、選択マーカー遺伝子を含む配列、プロモーターを含む配列、転写停止配列およびリンカーパー配列を合成することを包含する。その後、これら配列をクローニングしてプラスミドを生成させ、該プラスミドを制限エンドスクレアーゼで消化する。ラクトフェリンをコードする cDNA を制限部

位に挿入し、ついで真核細胞をラクトフェリンcDNAを発現する該プラスミドで形質転換する。

本発明の方法に使用する選択マーカー遺伝子は、ラクトフェリンcDNAプラスミドで形質転換された細胞の単離を可能とするものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、選択マーカー遺伝子は、*pyrA*、*pyrG*、*argB*、*trpC*および*andS*から選ばれる。

本発明において有用なプロモーターは、ラクトフェリンcDNAの転写を制御することができるものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、プロモーターはアルコールデヒドロゲナーゼ、*argB*、 α -アミラーゼおよびグルコアミラーゼよりなる群から選ばれる。

本発明において有用な転写停止配列は、ラクトフェリンmRNAの安定化を可能とするものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、転写停止配列は α -アミラーゼ、グルコアミラーゼ、アルコールデヒドロゲナーゼまたは*beta*NAに由来するものである。

本発明において有用なリンカー配列は、翻訳開始コドン、分離シグナルおよび制限酵素開裂部位を含むものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、リンカー要素は α -アミラーゼ、グルコアミラーゼまたはラクトフェリンに由来するものである。

本発明において有用な真核細胞は、ラクトフェリンcDNAを含むプラスミドを組み込むことができ、ラクトフェリンcDNAを発現することができるものであればいかなるものであってもよい。好ましくは、真核細胞は真菌細胞または昆虫細胞である。SF9などの昆虫細胞が本発明の方法に有用である。さらに好ましくは、真菌細胞は酵母細胞である。最も好ましくは、本発明において有用な真核細胞は、アスペルギルス・オリゼー、アスペルギルス・ニガー、アスペルギルス・ニデュランス (*A. Nidulans*) およびアスペルギルス・アワモリ (*A. Awamori*)などのアスペルギルス株である。

本明細書には本発明の目的を達成するための具体例について開示しているが、本発明の精神および範囲を逸脱しない範囲において方法および装置を若干改変し

てもよい。またクレームに記載の各要素および工程は実質的に同じまたは均等の結果をもたらすようすべての要素および工程を含むものである。また本発明は、その原理を利用する限りにおいていかなる態様も広く包含する。したがって、本発明は、その目的を達成し、開示の目的物および利点ならびに潜在的な他のすべてのものを達成するために適合されるものである。

【図1】

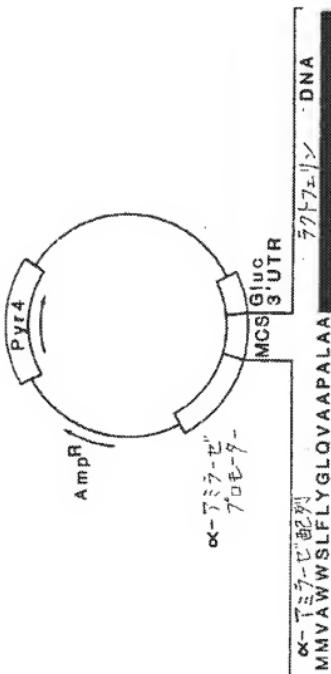


FIG. 1

【図2】

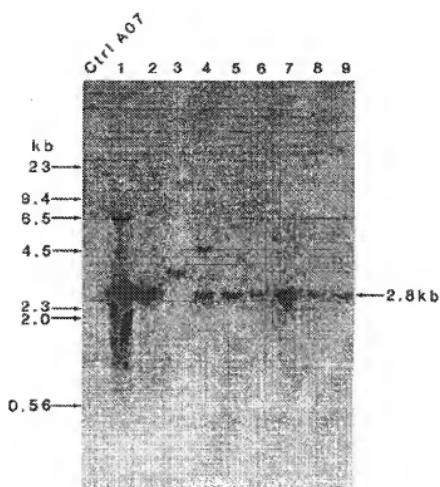


FIG. 2

【図3A】



FIG. 3A

【図3B】

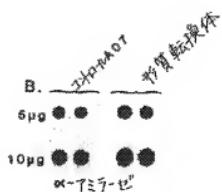


FIG. 3B

【図3C】

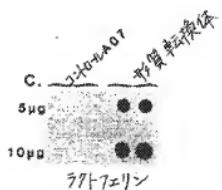
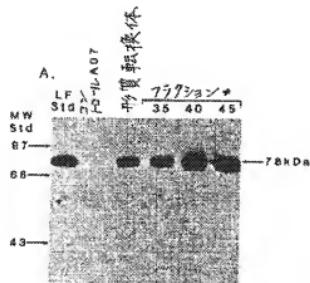


FIG. 3C

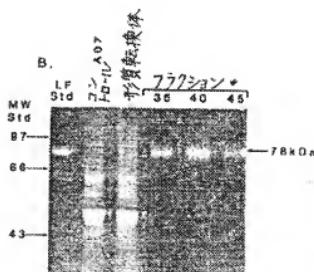
【図4 A】

FIG. 4A



【図4 B】

FIG. 4B



【図4C】



FIG. 4C

【図5A】

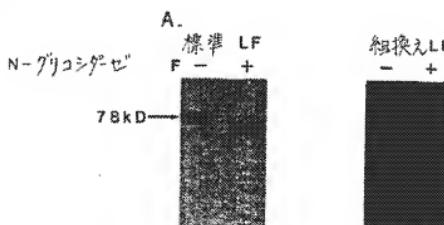


FIG. 5A

【図5B】

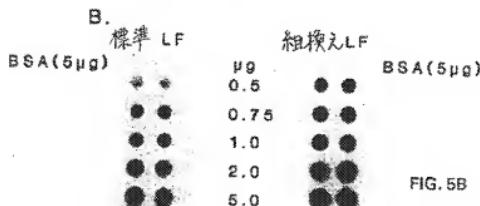


FIG. 5B

(图6.1)

CDNA SEQUENCE AND AMINO ACID SEQUENCE
OF HUMAN LACTOFERRIN

1
 GAATTC CACCGCAGAC
 18
 ATG AAA CTT GTC TTG CTC GTC CTG CTG TTC CTC GGG GCG CTC GGA CTC
 met lys leu val phe leu val leu leu phe leu gly ala leu gly leu
 1
 36
 TGT CTG CCT GGC CGT AGG AGA AGG AGT GTT CAG TGG TGC ACC GTA ICC
 cys leu ala gly arg arg arg arg ser val gln trp cys thr val ser
 17
 114
 CAA CCC GAG CCC ACA AAA TGC TTC CAA TGG CAA AGG AAT ATG AGA AGA
 gln pro gln ala thr lys cys phe gln trp gln arg asn met arg arg
 33
 162
 CTG CCT GGC CCT CCT GTC AGC TGC ATA AAG AGA GAC TCC CCC ATC CAG
 val arg gly pro pro val ser cys ile lys arg arg asp ser pro ile gln
 49
 210
 TGT ATC CAG GCC ATT GCG GAA AAC AGG GGC GAT GCT GTG ACC CTT GAT
 cys ile gln ala ile ala glu asn arg ala asp ala val thr leu asp
 65
 258
 CCT GGT TTC ATA TAC GAG GCA GGC CTG GCC CCC TAC AAA CTG CGA CCT
 gly gly phe ile tyr glu ala gly leu ala pro tyr lys leu arg pro
 81
 306
 GCA CGC CGC GAA GTC TAC GGG ACC GAA AGA CAG CCA CGA ACT CAC TAT
 val ala ala glu val tyr gly thr glu arg gln pro arg thr his tyr
 97
 354
 TAT GCC GTG CCT GTG GTG AAG AAG GGC GGC AGC TTT CAG CTG AAC GAA
 tyr ala val ala val val lys lys gly gly ser phe gln leu ssn glu
 113
 402
 CTG CAA GGT CTG AAG ICC TGC CAC ACA GGC CTT CGC AGG ACC GCT GGA
 leu gln gly leu lys ser cys his thr gly leu arg arg thr ala gly
 129
 450
 TGG AAT GTG CCT ATA CGG ACA CTT CCT CCA TTC TTG AAT TGG AGC GGT
 trp asn val pro ile gly thr leu arg pro phe leu ssn trp the gly
 145

Sheet 1 of 4

FIGURE 6

[图6]

498
 CCA CCT GAG CCC ATT GAG GCA GCT GTG CCC AGG TTC TTC TCA CCC ACC
 pro pro glu pro ile glu ala ala val ala arg phe ser ala ser
 161
 546
 TGT GTT CCC GCT GCA GAT AAA GGA CAG TTC CCC AAC CTG TGT CGG CTG
 cys val pro gly ala asp lys gly gin phe pro asn leu cys arg leu
 177
 594
 TGT GCG GGG ACA GGG GAA AAC AAA TGT GCC TTC TCC CAG GAA CCG
 cys ala gly thr gly glu asn lys cys ala phe ser ser gln glu pro
 193
 642
 TAC TTC AGC TAC TCT GGT GCC TTC AAG TGT CTG AGA GAC GGG GCT GGA
 tyr phe ser tyr ser gly ala phe lys cys leu arg asp gly ala gly
 209
 690
 GAC GTG GCT TTT ATC AGA GAG AGC ACA GTG TTT GAG GAC CTG TCA GAC
 asp val ala phe ile arg glu ser thr val phe glu asp leu ser asp
 225
 738
 GAC GCT GAA AGG GAC GAG TAT GAG TTA CTC TCC CCA GAC AAC ACT CCG
 glu ala glu arg asp glu tyr glu leu leu cys pro asp asn thr arg
 241
 786
 AAG CCA GTG GAC AAC TTC AAA GAC TGC CAT CTG CCC CGG GTC CCT TCT
 lys pro val asp lys phe lys asp cys his leu ala arg val pro ser
 257
 834
 CAT GCC GTT GTG GCA CGA AGT GTG AAT GCC AAG GAG GAT GCC ATC TGG
 his ala val val ala arg ser val asn gly lys glu asp ala ile trp
 273
 882
 AAI CTT CTC CGC CAG GCA CAG GAA AAC TTT GGA AAG GAC AAG TCA CGG
 asn leu leu arg gln ala gln gln lys phe gly lys asp lys ser pro
 289
 930
 AAA TTC CAG CTC TTT GGC TCC CCT AGT GGG CAG AAA GAT CTG CTG TTC
 lys phe gln leu phe gly ser pro ser gly gln lys asp leu leu phe
 305
 978
 AAG GAC TCT GCC ATT GGG TTT TCG AGG GTG CCC CCG AGG ATA GAT TCT
 lys asp ser ala ile gly phe ser arg val pro pro arg ile asp ser
 321
 1026
 GGC CTC TAC CTT GGC TCC GGC TAC TTC ACT GCC ATC CAG AAC TTG ACC
 gly leu tyr leu gly ser gly tyr phe thr ala ile gln asn leu arg
 337

[图 6]

1074
 AAA AGT GAC GAG GAA GTG CCT GCC CGG CGT CGG CGG GTC GTG TGG TGT
 lys ser glu glu glu val ala ala arg arg ala arg val val trp cys
 353

1122
 GCG GTG GCC GAG CAG GAG CTC CGC AAG TGT AAC CAG TGG ACT CGG TTG
 ala val gly glu gln glu leu arg lys cys asn gln trp ser gly leu
 389

1170
 AGC GAA GGC ACC GTG ACC TGC TCC TCG GCC TCC ACC ACA CAG CAC TGC
 ser glu gly ser val thr cys ser ser ala ser thr thr glu asp cys
 385

1218
 ATC GCC CTG CTG CTG AAA GGA GAA GCT GAT GCC ATG AGT TIG GAT GGA
 ile ala leu val leu lys gly glu ala asp ala met ser leu asp gly
 401

1256
 GGA TAT GTG TAC ACT GCA GGC AAA TGT GGT TIG GTC CCT GTC CTG GCA
 gly tyr val tyr thr ala gly lys cys gly leu val pro val leu ala
 417

1314
 GAG AAC TAC AAA TCC CAA CAA AGC AGT GAC CCT GAT CCT AAC TGT GTG
 glu asn tyr lys ser gln gln ser ser asp pro asp pro asn cys val
 433

1362
 GAT AGA CCT GTG GAA CGA TAT CTT CCT GTG GCG GTG GTT AGG AGA TCA
 asp arg pro val glu gly tyr leu ala val ala val val arg arg ser
 449

1410
 GAC ACT AGC CTT ACC TGG AAC TCT GTG AAA CGC AAG AAG TCC TGC CAC
 asp thr ser leu thr trp asn ser val lys gly lys lys ser cys his
 465

1458
 ACC GCC GTG GAC AGG ACT GCA GGC TGG AAT ATC CGC ATG GGC CTC CTC
 thr ala val asp arg thr ala gly trp asn ser val pro met gly leu leu
 481

1506
 TTC AAC CAG ACG GGC TCC TCC AAA TTT GAT GAA TAT TTC AGT CAA AGC
 phe asn gln thr gly ser cys lys phe asp glu tyr phe ser gln ser
 497

1554
 TCT GCC CCT GGG TCT GAC CGG AGA TGT AAT CTC TGT GCT GTG TGT ATT
 cys ala pro gly ser asp pro arg ser asn leu cys ala leu cys ile
 513

1602
 GCC GAC GAG CAG GGT GAG AAT AAG TGC GTG CCC AAC AGC AAT GAG AGA
 gly asp glu gln gly glu asn lys cys val pro asn ser asn gln arg
 529

[图 6]

1650 TAC TAC GGC TAC ACT GGG GCT TTC CGG TCC CTG GCT GAC AAT GCT GGA
 tyr tyr gly tyr thr gly ala phe arg cys leu ala glu asn ala gly
 545
 1698 GAG GIT GCA TTT GTG AAA GAT GTC ACT GTC TTG CAG AAC ACT GAT GGA
 asp val ala phe val lys asp val thr val leu glu asn thr asp gly
 551
 1746 AAT AAC AAT GAG GCA TGG GCT AAG GAT TTG AAG CTG GCA GAC TTT GCG
 asn asn asn glu ala trp ala lys asp leu lys leu ala asp phe ala
 557
 1794 CTG CTG TGC CTC GAT GGC AAA CGG AAG CCT GTG ACT GAG GCT AGA ACC
 leu leu cys leu asp gly lys arg lys pro val thr glu ala arg ser
 593
 1842 TSC CAT CTT CCC ATG GCC CGG AAT CAT GCC GTG GTG TCT CCG ATG GAT
 cys his leu ala met ala pro asn his ala val val ser arg met asp
 609
 1890 AAG GTG GAA CGC CTG AAA CAG GTG CTG CTC CAC CAA CAG GCT AAA TTT
 lys val glu arg leu lys gln val leu leu his gln gln ala lys phe
 625
 1938 GGG AGA AAT GGA TCT GAC TGC CGG GAC AAG TTT TGC TTA TTC CAG TCT
 gly arg asn gly ser asp cys pro asp lys phe cys leu phe glu ser
 641
 1986 GAA ACC AAA AAC CTT CTC TTC AAT GAC AAC ACT GAG TGT CTG CCC AGA
 glu thr lys asn leu leu phe asn asp asn thr glu cys leu ala arg
 657
 2034 CTC CAT CGC AAA ACA ACA TAT GAA AAA TAT TTG GGA CCA CAG TAT GTC
 leu his gly lys thr thr tyr glu lys tyr leu gly pro gln tyr val
 673
 2082 GCA GGC ATT ACT AAT CTG AAA AAG TGC TCA ACC TCC CGG CTC CTG GAA
 ala gly ile thr asn leu lys cys ser thr ser pro leu leu glu
 689
 2130 GCG TGT GAA TTC CTC AGG AAG TAA
 ala cys phe leu arg lys *** ACCCAA CAAGATGCC CAGCTCCCCA
 705
 2180 AGAAAGCTC AGCCATTCAC TGGCCCCAGC TCTCTCCCC AGGTGIGTTG GGGCTTGGC
 2240 TCCCCCTGCTG AAGGTGGGGA TTGGCCATCC ATCTGCTTAC AATTCCTG C TGTCTCTTA
 2300 GCAAGAAAGTA AAATGAGAAA TTTTGTGAA AAAAAAAA AAAAAAAA AAAAAAAA

[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US93/03614
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(S): C07K 15/06, 15/14, C12N 15/04, 15/06, 15/10, 15/12 US CL: 536/23.5; 510/350, 394; 435/69.1, 240.2, 254, 255, 320.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. . . 536/23.5, 510/350, 394, 435/69.1, 240.2, 254, 255, 320.1		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) APS, DIALOG, Swisspat, PIR, search terms: lactoferrin, amylase, oryzate, aspergillus, cDNA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Biochemical Journal, Volume 276, issued June 1991, Stowell et al., "Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells", pages 349-355, see especially p. 350, column 2.	I.3.4.8.10.11.13. 16-18.21 1-21
Y	WO, A, 89/01969 (Woldike, H.F.) 09 March 1989, see whole publication, especially pages 3, 5, 6, 10 and 11.	I-21
Y	Gene, Volume 79, issued 1989, Gines et al., "Aspergillus oryzae has two nearly identical Taka-amylase genes, each containing eight introns", pages 107-117, see especially the abstract and Figures 2 and 3.	I-21
Y	Journal of Molecular Biology, Volume 173, issued 1984, G. von Heijne, "How signal sequences maintain cleavage specificity", pages 243-251, see especially page 244.	I-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family entries.		
* Special categories of cited documents:		
'A'	documents defining the general state of the art which is not considered to be part of particular relevance	*"*
'B'	earlier documents published on or after the international filing date	*"*
'C'	documents which, even though older than the priority claimed or which are not to establish the earliest date of another citation or other special reason (as specified)	*"*
'D'	documents referred to as end documents, i.e. exhibits or other documents	*"*
'E'	documents published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	*"*
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 May 1993		27 JUL 1993
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box 1450 Washington, D.C. 20231		Authorized officer <i>Keith C. Furman</i> KEITH C. FURMAN, PH.D. Telephone No. (703) 308-0146
Facsimile No. . . NOT APPLICABLE		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US93/03614
□ (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category ⁴	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nucleic Acids Research, Volume 18, Number 13, issued 1990, Powell et al., "Nucleotide sequence of human lactoferrin cDNA", page 4013.	1-21
Y	Lipids, Volume 24, Number 9, issued 1989, Hugo-Jensen et al., "Rhizomucor miehei triglyceride lipase is processed and secreted from transformed <u>Aspergillus oryzae</u> ", pages 781-785, see especially the abstract.	1-21
Y	US, A, 4,740,461 (Kaufman) 26 April 1988, see whole patent, especially Table 1 and columns 11 and 12.	1-21
Y,P	US, A, 5,155,037 (Summers) 13 October 1992, filed 04 August 1989, see whole patent, especially columns 1 and 4-8.	1, 3, 8, 10, 11, 12, 16-18, 21

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶ 認別記号 序内整理番号 F I
 C 12 N 5/10 15/09
 // (C 12 N 1/19 C 12 R 1:66)
 (C 12 N 5/10 C 12 R 1:91) // (C 12 N 5/00 A
 C 12 R 1:91)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
 C, NL, PT, SE), AT, AU, BB, BG, B
 R, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB
 , HU, JP, KP, KR, LK, LU, MG, MN,
 MW, NL, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, S
 E, SK

(72)発明者 オマリー、パート・ダブリュー
 アメリカ合衆国77079テキサス、ヒュース
 トン、ランブルウッド639番

(72)発明者 メイ、グレゴリー・エス
 アメリカ合衆国77025テキサス、ヒュース
 トン、ダーネス4119番